文章编号：0454-6296（2000）02-0134-04

不同品系小菜蛾成虫脑突触体蛋白质磷酸化的研究

韩招久[1]，田　雨[2]，李凤良[1]，李忠英[1]，陈之浩[1]
（1. 贵州省农业科学院植物保护研究所，贵阳　550006；2. 中国科学院动物研究所，北京　100080）

摘要：对小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）敏感品系、抗溴氰菊酯品系、抗杀虫双品系和抗杀螟丹品系的成虫脑突触体蛋白质磷酸化进行了研究比较。结果表明：蛋白质磷酸化在各个品系中的表现是不一样的。cAMP和钙加钙调蛋白对不同品系小菜蛾脑蛋白质磷酸化都有不同程度的刺激作用；3种杀虫剂均对各品系小菜蛾的磷酸化反应有影响，杀虫双、杀螟丹表现为抑制，溴氰菊酯表现为加强。这种影响在敏感品系中表现得比抗性品系中要强烈。

关键词：小菜蛾；抗药性；蛋白质磷酸化
中图分类号：Q965.9　　　**文献标识码**：A

蛋白质磷酸化是利用某一种蛋白激酶把ATP上的Pi转移到底物蛋白上，这种反应在生理调节的生化机制中起着重要作用[1]。蛋白质磷酸化不仅参与代谢中间物的调节，而且参与很多细胞功能的调节[2]，目前被认为是各种生物调节的共同途径[3]。蛋白质磷酸化是研究很多神经生理现象分子基础的一个途径，有时是唯一可行的途径[4]。近来的一些研究表明，神经毒剂对神经系统蛋白质磷酸化有重要影响[5,6]。

昆虫对杀虫药剂的抗性机理是多方面的，关于解毒酶活性、作用靶标的敏感性以及表皮穿透性等方面，近年来国内外有很多研究报道。但关于抗性昆虫神经系统蛋白质磷酸化的研究则少有报道。本文以室内选育出抗溴氰菊酯品系、抗杀虫双、抗杀螟丹品系和敏感品系的小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）为材料，研究其成虫脑突触体蛋白质磷酸化作用。

1　材料与方法

1.1　化学试剂

溴氰菊酯（IR-deltamethrin），纯度99%，法国罗素优克福公司赠送；杀虫双，贵州省化工研究院，纯度>99%；杀螟丹，纯度98%，日本武田株式会社；Tris、EDTA、甲叉双丙烯酰胺、BSA为美国SIGMA化学公司出品；Ficoll-400购于Pharmacia Inc. 公司；Adenosine triphosphate（ATP）由British Drug House LTD. 出品；丙烯酰胺、SDS为E. Merck，Darin Stadt公司出品；巯基乙醇、考马氏亮蓝R-250购于Fluka Chemic. Co.；过硫酸铵为Bio-Rad

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39560052）
收稿日期：1998-02-25；修订日期：1999-02-01

产品；TEMED 美国 Koch-Light 公司产品；钙调蛋白购于北京师范大学生物系；r-^{32}P-ATP，放射比活度>5 000 ci/mmol，放化纯度 95%，北京亚辉生物医学工程公司产品；其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 供试昆虫

小菜蛾敏感品系和 3 个小菜蛾抗性品系：即抗溴氰菊酯品系、抗杀螟丹品系、抗杀虫双品系。实验用的品系均由贵州省农科院植保所抗药性课题组室内连续继代选育而成。抗性品系及敏感品系的 LD_{50}值与抗性倍数见表 1。测定方法参照陈之浩等（1994）[7]方法。

表 1　小菜蛾各品系对各杀虫药剂的 LD_{50}值（μg/larva）及抗性倍数

Table 1　LD_{50} of insecticides against diamond back moth strains and resistance ratios

品系 Strain	溴氰菊酯 Deltamethrin	杀螟丹 Cartap	杀虫双 Dimehypo	抗性倍数 RR*
敏感品系 Susceptible strain	0.069	0.718	0.741	—
抗溴氰菊酯品系 Deltamethrin resistant strain	95.737	—	—	1 382.2
抗杀螟丹品系 Cartap resistant strain	—	25.524	—	35.5
抗杀虫双品系 Dimehypo resistant strain	—	—	91.00	122.8

* 抗性品系 LD_{50}/敏感品系 LD_{50}

1.3 小菜蛾成虫脑突触体样品的制备

用低温速冻（－30℃～－40℃）振动过筛的方法分离与搜集小菜蛾成虫头部。脑突触体的制备参照 Luo 等（1987）的方法[8]。小菜蛾头部于 0.25 mol/L mannitol 缓冲液（pH7.4 含 1 mmol/L Na_2 EDTA）匀浆，匀浆液经1 270 g离心 10 min；上清液置27 100 g，高速低温离心 15 min 后，弃上清液，将沉淀重新悬浮，于 Ficoll-400 密度梯度（4%，22%）65 000 g离心 2 h。悬浮于两浓度梯度之间的组分即为所制备的突触体蛋白，将其取出重新稀释于 27 100 g离心 15 min，沉淀用 0.24 mol/L Tris-HCl（pH7.6 含 80 mmol/L $MgCl_2$）缓冲液定容后备用。

蛋白质含量测定参照 Bradford（1976）[9]方法。

1.4 蛋白质磷酸化反应

参照姜建成、冷欣夫（1989）[5]方法。反应混合总体积为 80 μL，其中含 0.24 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH7.6 含 80 mmol/L $MgCl_2$）24 μL，样品蛋白 30 μg。不同处理组分别含有：（1）2.5×10^{-5} mol/L cAMP 10 μL；（2）6 mmol/L $CaCl_2$ 10 μL 和 10^{-5} mol/L 钙调蛋白（Calmodulin）10 μL（缓冲液 14 μL）；（3）10^{-4} mol/L 溴氰菊酯 10 μL；（4）10^{-2} mol/L 杀螟丹 10 μL；（5）10^{-2} mol/L 杀虫双 10 μL。混合液于 37℃ 预保温 2 min，加入 125 μmol/L [r-^{32}P]ATP（8 μCi）16 μL 启动反应，37℃ 反应 1 min，用冰冷丙酮停止反应，离心后的沉淀用电泳样品缓冲液（pH6.8，0.125 mmol/L Tis-HCl 缓冲液）悬浮，作为电泳样品备用。

1.5 SDS-PAGE 电泳及放射自显影

使用 Bio-Rad 3000Xi 型分析电泳仪，浓缩胶浓度为 10%，分离胶浓度为 4%，电泳条件 200 V，60 min。电泳胶片用考马氏亮蓝 R-250 染色。风干后的胶片经 X 光片压片进行放射自显影两周，曝光后，对 X 光片进行照相洗片得蛋白质磷酸化结果（图 1）。

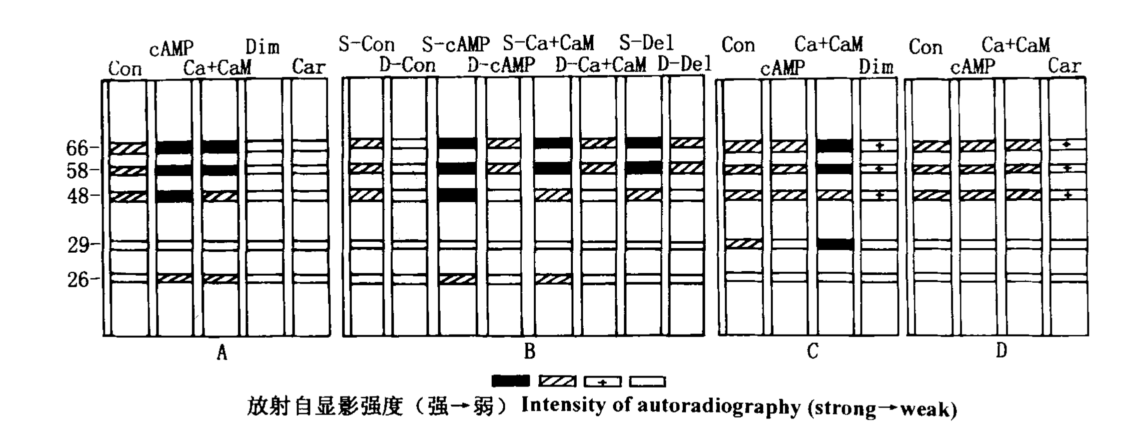


图1 不同品系小菜蛾成虫脑蛋白质磷酸化

Fig.1 Pattern of protein phosphorylation in the susceptible strain and resistant strains of diamond back moth

Con. 对照；Ca+CaM. 钙和钙调蛋白；Del. 溴氰菊酯；Dim. 杀虫双；Car. 杀螟丹；A. 敏感品系；B. 敏感品系和抗溴氰菊酯品系，S-敏感品系，D-抗溴氰菊酯品系；C. 抗杀虫双品系；D. 抗杀螟丹品系

2 结果与讨论

从放射自显影图可见有5条P^{32}标记的磷酸化蛋白质条带，分子量分别为66 kD，58 kD，48 kD，29 kD和26 kD。杀虫双和杀螟丹对敏感品系的蛋白质磷酸化有强烈的抑制作用，而对相应的抗性品系的抑制作用则较弱。敏感品系对溴氰菊酯的刺激作用表现敏感，磷酸化水平提高，抗溴氰菊酯品系则不敏感。cAMP和Ca^{2+}加calmodulin（钙调蛋白）都对敏感品系的蛋白质磷酸化有提高，特别是对26 kD蛋白质磷酸化的刺激作用尤为明显，这种刺激作用在抗性品系中的表现要相对的弱一些，抗杀螟丹品系尤为不敏感。

溴氰菊酯、杀虫双、杀螟丹均为神经毒剂，对小菜蛾脑突触体的蛋白质磷酸化都有影响，其中杀虫双和杀螟丹表现为抑制，而溴氰菊酯则是加强。神经毒剂在昆虫的毒杀作用时，对神经系统的蛋白质磷酸化的影响可能是一个重要的机制。蛋白质磷酸化反应有的依赖cAMP的蛋白激酶，也有的依赖Ca^{2+}加钙调蛋白的蛋白激酶。试验显示cAMP和Ca^{2+}加钙调蛋白对小菜蛾脑蛋白质磷酸化均有刺激作用，在抗性品系中，这种刺激作用变弱或不明显，这或许是在药剂选择压力的作用下的一种适应。杀虫双和杀螟丹都是沙蚕毒素类杀虫剂，作用位点是突触后膜的受体，昆虫中毒后出现麻痹而死亡。试验表明杀虫双和杀螟丹对小菜蛾脑突触体的蛋白质磷酸化有抑制作用且在敏感品系中尤为强烈，但在抗性品系中表现不如此敏感。一般认为溴氰菊酯作用位点是轴突的离子通道，昆虫中毒后表现为兴奋，然后被击倒死亡。由试验的自显影图显示，溴氰菊酯对小菜蛾脑蛋白质磷酸化反应的刺激作用在敏感品系中要比在抗性品系中强烈。蛋白质磷酸化是研究神经分子生理现象的一个途径，昆虫对神经毒剂产生抗性后其神经系统的生理生化机制和调节功能会发生相应的变化，可能是引起神经系统

的蛋白质磷酸化发生相应的适应性变化。昆虫对不同的神经毒剂形成抗性的过程和机理不尽相同，表现在神经生理生化反应中有各自的特异性。是否抗性形成影响基因的表达和蛋白质的性质？更进一步的机理有待研究。本研究表明，小菜蛾对杀虫双、杀螟丹、溴氰菊酯产生抗性后，脑突触体蛋白质磷酸化的性质和水平发生了改变，杀虫剂对小菜蛾的选择作用导致对神经系统起生理调节作用的蛋白质磷酸化过程产生变化。

参　考　文　献（References）

［1］ Browning M D，Hugnir R，Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. J. Neurochem.，1985，45（1）：11～23

［2］ Wallas S I，Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. Pharmacological Review，1991，（43）：299～349

［3］ Greengard P. Phosphorylation protein as physiological effectors. Science，1978，199：146～152

［4］ Nestler E J，Greengard P. Protein phosphorylation in the brain. Nature. 1983 ，305（13）：583～588

［5］ 姜建成，冷欣夫. 溴氰菊酯对鼠脑蛋白质磷酸化的影响. 生物化学杂志，1989，5（5）：401～405

［6］ Ishikawa Y，Charalambous P，Matsumura F. Modification by pyrethroids and DDT of phosphorylation activities of rat brain sodium channel. Biochemical Pharmacology，1989，38（15）：2 449～2 459

［7］ 陈之浩，刘传秀，李凤良等. 杀虫双和杀螟丹选育对小菜蛾抗药性的形成及其抗性机制. 昆虫学报，1993，36（4）：409～418

［8］ Luo M，Bodnaryk R P. Synaptosomes and synaptosome membrane vesicles from the brain of Marestra Configurata：application to voltage-dependent Ca^{2+} ion transport studies. Insect Biochem.，1987，17（6）：911～918

［9］ Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem.，1976，72：248～254

Phosphorylation of synaptosomal protein from adult brains of resistant and susceptible strains of diamond back moth

HAN Zhao-jiu[1]，TIAN Yu[2]，LI Feng-liang[1]，LI Zhong-ying[1]，CHEN Zhi-hao[1]

（1. Plant Protection Institute，Guizhou Academy of Agricultural Sciences，Guiyang　550006；
2. Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing　100080）

Abstract: The phosphorylation of synaptosomal protein from adult brains of three resistant strains and a susceptible strain of diamond back moth，*Plutella xylostella* had been studied. The result showed that the level of protein phosphorylation differed between resistant and susceptible strains. Calmodulin could promoted the protein phosphorylation differently in strains studied，so was cAMP. But the susceptible strain expressed higher sensitivity. Both dimehypo and cartap inhibited the protein phosphorylation more in the susceptible strain than in dimehypo resistant and cartap resistant strains. Deltamethrin，however，activated the protein phosphorylation stronger in the susceptible strain than in deltamethrin resistant strain. The study reveals that insecticide resistance of diamond back moth might result in changes of protein phosphorylation in nervous system，leading modification of nervous regulation.

Key words: diamond back moth；resistance；protein phosphorylation